



The neuronal mechanism underlying species-specific courtship behaviors in *Drosophila subobscura*

著者	田中 良弥
号	15
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	生博第354号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00122716

	たなか りょうや
氏名（本籍地）	田中 良弥
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	生博第 354 号
学位授与年月日	平成 3 0 年 3 月 2 7 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科，専攻	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）生命機能科学専攻
論文題目	The neuronal mechanism underlying species-specific courtship behaviors in <i>Drosophila subobscura</i> (<i>Drosophila subobscura</i> の種特異的な求愛行動を生み出す神経メカニズム)
博士論文審査委員	(主査) 教授 山元 大輔 教授 松居 靖久 助教 山方 恒宏

論文内容の要旨

【研究背景・目的】

動物の行動は、外部形態がそうであるように種によって大きく異なる。動物の外部形態の多様性を生み出すメカニズムは進化発生学の視点から多くの知見が蓄積しつつある。一方で、動物行動の種特異性を規定する神経メカニズムについてはほとんど理解が進んでいない。本研究では、この問題に取り組むためにショウジョウバエ属の雄が示す求愛行動に着目した。

キイロショウジョウバエと同属の *Drosophila subobscura* (*D. subobscura*) はショウジョウバエ属の他種には見られないユニークな求愛行動をとる。最も特徴的な点は、交尾の直前に雄が雌に消化管から吐き戻した内容物を与える「婚姻贈呈」を示すことである。先行研究によってキイロショウジョウバエの雄が示す求愛行動の形成には *fruitless* (*fru*) 遺伝子の働きが必要であることが知られている。*fru* は転写因子をコードしており、雄の神経細胞でのみ Fru タンパク質が作られる。この雄特異的に存在する Fru タンパク質の働きによって神経細胞の雄化が誘導され、求愛行動を引き起こす神経回路が生み出されると考えられている。

従来、モデル生物以外の動物種では遺伝学的な手法が使用できないため、これらの種の行動に関わる神経メカニズムを解析することは困難であった。ところが、近年登場した CRISPR/Cas9 システムによって動物種を問わず、ゲノムを改変することが可能になりつつある。CRISPR/Cas9 システムはゲノム編集技術の一つであり、guideRNA (gRNA) と Cas9 ヌクレアーゼ (Cas9) の二種類の分子がその主役である。gRNA はゲノム中の標的配列と相同な配列を持ち、ゲノム中の標的配列に対して Cas9 による変異の導入やドナーDNA のノックインを誘導する。

本研究では、*D. subobscura* に対して CRISPR/Cas9 システムを適用することで *fru* 発現神経回路の可視化や神経活動の操作を実現し、婚姻贈呈を含む本種に特異的な求愛行動を生み出す神経メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【実験内容】

1 *D. subobscura* における *fru* 変異体の表現型解析

CRISPR/Cas9 システムを用いて *D. subobscura* の *fru* 変異体を作製した。抗 Fru 抗体を用いた免疫染色によって、コントロールのヘテロ接合体では雄特異的な Fru タンパク質の発現が見られたが、変異ホモ接合体およびメスの脳では Fru タンパク質が発現していないことがわかった。また、変異ホモ接合体の雄は雌に対して求愛行動を示さないことがわかった。以上の結果から、Fru タンパク質は *D. subobscura* においても雄特異的に発現しており、求愛行動の実現に関与していることが示された。

2 CRISPR/Cas9 システムを用いたドナーベクターのノックイン

求愛行動の種特異性が *fru* 発現神経回路に起因するのかを調べるためには、この神経回路を特異的に標識・操作する必要がある。これを実現するために、CRISPR/Cas9 システムを用いて *fru* 遺伝子座に外来遺伝子を導入する手法を確立した。1 で用いた gRNA の標的配列の両端を相同鎖として持ち、その間に光遺伝学ツールであるチャンネルロドプシンをコードするドナーベクターを作製した。このドナーベクターを gRNA、Cas9 と共に胚に微小注入することで、チャンネルロドプシン遺伝子を *fru* 遺伝子座にノックインすることに成功した。

3 *fru* 発現神経回路の可視化

2 で作製した形質転換体のチャンネルロドプシンは *fru* と同様の発現パターンを示すことが期待される。免疫染色法によって確認したところ、チャンネルロドプシンは *fru* の発現パターンを正確に再現しており、キイロショウジョウバエの *fru* 発現神経回路に見られる特徴的な構造が本種でも保存されていることがわかった。

4 光遺伝学的手法を用いた *fru* 発現神経回路の強制活性化

D. subobscura の *fru* 発現神経回路がどのような行動要素の解発に寄与しているかを調べるために、光遺伝学的手法を用いて *fru* 発現神経回路の神経活動を強制的に活性化した。その結果、交尾試行に加えて、婚姻贈呈に見られるような消化管の内容物を吐き戻す行動が見られた。この結果は、*D. subobscura* の *fru* 発現神経回路が種特異的な求愛行動である「婚姻贈呈」の解発に関わることを示唆しており、特定の神経回路が求愛行動の種特異性を規定している可能性を示している。

論文審査結果の要旨

動物の行動は種により異なり、この種差は行動の基盤をなす神経回路の構造・機能の違いに根ざすと考えられるが、その実体は不明である。本研究では、この問題にアプローチすべく、ショウジョウバエの一種、*Drosophila subobscura* に固有の求愛行動を作り出す神経回路の同定をめざした。この種の雄は、雌に口移しで消化物を与える婚姻贈呈を行うが、この行動は同属他種には見られない。同属の *D. melanogaster* は遺伝学のモデル生物であり、求愛行動を生み出す神経回路の解析が進んでいる。ここで注目されているのが、*fruitless* 遺伝子を発現するニューロンからなる神経回路である。*fruitless* 遺伝子はニューロンの雄化因子をコードし、約二千個のニューロンに性分化を誘導する。雌のニューロンに **Fruitless** タンパク質を人工的に作らせると、それらの雌は雄の求愛行動を示すことから、*fruitless* 遺伝子は求愛行動回路形成のマスターレギュレーターとされている。そこで本研究では、特有の行動様式を持つ *D. subobscura* の *fruitless* 遺伝子を CRISPR/cas9 法を用いて改変・操作してその役割の解明を試みた。まず、*fruitless* 遺伝子に欠失を持つ機能喪失型突然変異のホモ接合雄は、雌に全く求愛しないことがわかった。続いて、**Venus** を蛍光タグとして持つ **Channelrhodopsin** のコード配列を *fruitless* 遺伝子座に導入した。**Venus** によって可視化されるニューロン群は **Fruitless** 抗体で標識される細胞とほぼ一致していた。すなわち、*fruitless* 神経回路が **Venus** によって可視化されたと考えられる。続いて光照射によってこれらのニューロンを強制的に活性化したところ、その雄は腹部を曲げて交尾姿勢をとり、また一部のものは婚礼贈呈のコア要素である消化物の吐き戻しを示した。こうして、*D. subobscura* に固有の求愛行動が *fruitless* 発現ニューロンに依存して作り出されることが明らかとなった。このように、行動の多様性の基盤となる遺伝子・細胞機構の解明に先鞭をつける研究で成果を上げたことは、田中が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、田中良弥提出の論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認める。